

# 은행잎 추출물(EGb 761)에 의한 IL-1 $\beta$ 유도 MUC5AC 유전자 발현의 억제

연세대학교 의과대학 이비인후과학교실,<sup>1</sup> 기도점액연구소,<sup>2</sup> 제주대학교 의과대학 이비인후과학교실<sup>3</sup>

장정현<sup>1</sup> · 김정홍<sup>3</sup> · 이근완<sup>1</sup> · 조창일<sup>1</sup> · 전주현<sup>1</sup> · 김정수<sup>1,2</sup>

## Suppression of IL-1 $\beta$ -induced MUC5AC Gene Expression by *Ginkgo biloba* Extract(EGb 761) in Human Airway Epithelial Cells

Jung Hyun Chang, MD<sup>1</sup>, Jeong Hong Kim, MD<sup>3</sup>, Kun Wayn Lee, MD<sup>1</sup>,  
Chang Il Cho, MD<sup>1</sup>, Ju Hyun Chun, MD<sup>1</sup> and Kyung-Su Kim, MD<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Department of Otorhinolaryngology and <sup>2</sup>The Airway Mucus Research Institute,  
Yonsei University College of Medicine, Seoul; and <sup>3</sup>Department of Otorhinolaryngology,  
Cheju University College of Medicine, Jeju, Korea

### ABSTRACT

**Background and Objectives** : The purpose of this study is to investigate whether Ginkgo biloba extract (EGb 761) can suppress IL-1 $\beta$ -induced MUC5AC gene expression in NCI-H292 human airway epithelial cells and to discover what its possible mechanism is. **Materials and Methods** : NCI-H292 human pulmonary mucoepidermoid carcinoma cell line was used. MUC5AC mRNA and protein were measured using the RT-PCR and Western blot analysis. The activation of mitogen activated protein kinases (MAPKs) were determined by means of the Western blot analysis. **Results** : MUC5AC was induced by treating the NCI-H292 cells with 10 ng/ml of IL-1 $\beta$  for 24 hours. A pre-treatment of 200  $\mu$ g/ml of EGb 761 significantly suppressed the IL-1 $\beta$  induced MUC5AC expression. The inhibition of MUC5AC gene expression by EGb 761 was noted to be suppressed via both the extracellular signal-regulated kinase (ERK) and the p38 MAPK pathways in a kinase-specific inhibitor study. **Conclusion** : EGb 761 suppresses IL-1 $\beta$ -induced MUC5AC gene expression in the human airway epithelial cells. Therefore, it may be considered as a possible anti-hypersecretory agent.

**KEY WORDS** : Ginkgo biloba extract 761 · Interleukin-1 $\beta$  · Mucins · Epithelial cells.

### 서 론

은행잎 추출물중 EGb 761은 아세톤과 물을 이용한 추출과정, 지방 친화성분의 제거, 활성물질 강화, 폴리페놀 성분 제거 등의 추출과정을 거쳐 만들어진다.<sup>1)</sup> EGb 761의 임상적 이용은 1965년 Dr. Willmar Schwabe가 이를 이용하여 순환장애, 뇌혈관 질환 등의 치료에 효과를 보았다고 발표한 이후 뇌 및 말초혈관의 혈류량 저하, 감각신경 질환, 기억력 및

인지능 저하 등의 질환에 대해 효과가 있는 것으로 알려져 있다.<sup>1)2)</sup> 또한 최근 연구에 의하면 항산화 기능, 신생혈관 억제 기능, 세포 독작용, COX-2 및 iNOS의 억제 작용, 유전자 조절기능 등의 작용으로 세포증식 억제 효과도 보인다고 한다.<sup>3)4)</sup> EGb 761은 폐 질환에 임상효과를 보이는데, 그 구성성분의 하나인 ginkgolide가 천식에 효과가 있다고 한다. 가능한 기전으로 천식의 유발인자인 platelet-activating factor를 억제하는 작용과 그 수용체의 억제 작용, T 림프구의 억제 작용 등이 밝혀져 있다.<sup>5)6)</sup>

비염을 비롯한 급, 만성 부비동염, 기관지염과 기관지 천식 같은 염증성 기도 질환의 경우, 과분비된 점액은 기도 점막의 점액섬모운동능을 감소시키고 이차적인 세균 감염을 유발하여 다양한 호흡기 질환을 초래하게 된다. 이 때 점액의 과분비는 여러 종류의 사이토카인이나 펩타이드, 염증 매개

본 논문은 2006학년도 연세대학교 의과대학 교수연구비(6-2006) 지원에 의해 이루어졌음.

논문접수일 : 2007년 2월 25일 / 심사완료일 : 2007년 4월 5일

교신저자 : 김정수, 135-720 서울 강남구 도곡동 146-92

연세대학교 의과대학 이비인후과학교실

전화 : (02) 2019-3463 · 전송 : (02) 3463-4750

E-mail : ydrhinol@yumc.yonsei.ac.kr

물질이 직·간접적으로 관여하여 *MUC5AC*나 *MUC8*과 같은 점액 유전자의 발현을 상향 조절시켜 일어나게 되는데, 대표적인 염증 유발 사이토카인인 IL-1 $\beta$ 가 기도점막 상피세포에서 과다 분비되는 경우에 기도 염증 반응이 더욱 촉발되는 것으로 알려져 있다.<sup>7,8)</sup> 또한 최근 사람 정상 코점막 상피세포 및 사람 폐 점액상피양 암종 세포주(NCI-H292)에 대한 연구에서, IL-1 $\beta$ 에 의해 유도되는 *MUC5AC*의 과발현이 extracellular signal-regulated kinase(ERK)/p38 mitogen activated kinase(MAPK), mitogen- and stress-activated protein kinase 1(MSK1), cyclic-AMP response element binding protein(CREB) 신호전달 체계의 순차적인 활성화에 의해 기도 상피세포에서 일어나는 것임이 밝혀진 후 점액 과분비 조절을 통한 염증성 기도 질환의 치료 전략에 새로운 관점을 제공하게 되었다.<sup>9)</sup>

현재까지는 사람 호흡기 상피세포에서 점액 과분비 조절 물질로서 dexamethasone 혹은 budesonide가 점액 생산 및 점액 유전자의 발현을 억제한다는 연구 결과가 있으나,<sup>10,11)</sup> EGb 761과 같은 천연 추출물 성분에 의한 기도 점액 과분비 조절에 대한 연구는 미흡한 실정이다. 이에 본 연구의 목적으로 첫째, 폐 점액상피양 암종 세포주인 NCI-H292 세포에서 IL-1 $\beta$ 에 의해 *MUC5AC* mRNA가 유도되는지 알아보고 둘째, IL-1 $\beta$  유도 *MUC5AC* mRNA의 발현이 EGb 761에 의해 억제되는지 확인하고 셋째, EGb 761에 의한 *MUC5AC* mRNA 발현 억제의 작용기전을 알아보려고 하였다.

## 재료 및 방법

### 폐 점액상피양 암종 세포주 배양

사람 호흡기 상피세포인 사람 폐 점액상피양 암종 세포주(human pulmonary mucoepidermoid carcinoma cell line)인 NCI-H292 세포는 American Type Culture Collection(Rockville, MD, USA)에서 구입하였다. 이 세포주는 95%의 공기와 5%의 이산화탄소, 가습화된 환경에서 37℃의 온도로 10% fetal bovine serum과 2 mM L-glutamine, penicillin(100  $\mu$ g/ml), streptomycin(100  $\mu$ g/ml)이 포함된 RPMI-1640 배지(Gibco BRL, Grand Island, NY, USA)에서 배양하였다. 분주 후 밤새 배양한 다음 세포를 24시간 동안 0.5% fetal bovine serum을 포함하는 RPMI-1640 배지에서 배양한 후 실험하였다.

### 재 료

EGb 761은 유유산업(Seoul, Korea)에서 기증받아 사용하였다. ERK에 대한 특이 억제제(specific inhibitor)인 PD98059,

p38 MAPK에 대한 특이 억제제인 SB203580 등은 Calbiochem Biochemicals(San Diego, CA, USA)에서, IL-1 $\beta$ 는 R & D Systems(Minneapolis, MN, USA)에서 구입하였고, anti-phospho-p44/42 MAPK(Thr<sup>202</sup>/Tyr<sup>204</sup>) 항체, anti-phospho-p38 MAP kinase(Thr<sup>180</sup>/Tyr<sup>182</sup>) 항체, anti-phospho-SAPK/c-jun NH2-terminal kinase(JNK)(Thr<sup>183</sup>/Tyr<sup>185</sup>) 항체 등은 Cell Signaling(Beverly, MA, USA)에서 구입하였다.

### *MUC5AC* mRNA의 역전사-중합효소 연쇄반응(reverse transcriptase-polymerase chain reaction) 분석

전체 RNA는 Tri-Reagent(Molecular Research Center, Cincinnati, OH, USA)를 이용하여 각 조건으로 배양된 세포에서 얻었으며 전체 RNA에서 cDNA로의 역전사는 1  $\mu$ g/20  $\mu$ l의 전체 RNA를 random hexanucleotide primer와 Moloney murine leukemia virus 역전사효소(Gibco-BRL)를 이용하였고, 중합효소 연쇄반응은 Perkin-Elmer Cetus DNA Thermal Cycler(Perkin-Elmer, Norwalk, CT, USA)를 이용하였다. 중합효소 연쇄반응에 사용한 oligonucleotide 시발체(primer)는 *MUC5AC*의 GenBank<sup>TM</sup> sequence(GenBank<sup>TM</sup> accession number AJ001402)에 근거하여 5' primer CGA-CAACTACTTCTGCGGTGC ; 3' primer GCACTCATCCTT-CCTGTGCTT를 사용하여 337 bp를 증폭하였다. 각 반응의 대조군으로 사용된  $\beta_2$ -microglobulin( $\beta_2$ M)의 oligonucleotide primer는 Clontech Laboratories(Palo Alto, CA, USA ; 335 bp fragment)에서 구입하였다. *MUC5AC*의 중합효소 연쇄반응은 95℃에서 30초간 변성(denaturation) 과정과 60℃에서 60초간 결합(annealing) 반응, 72℃에서 60초간 연장(extension) 반응을 35회 진행하였고 증폭된 PCR 산물은 2% 한천 겔에서 전기영동하여 ethidium bromide 용액으로 염색하여 밴드를 관찰하였고, 이를 sequencing하여 염기 서열을 확인하였다. 확인된 밴드의 세기는 Scion Image(Scion Co., Frederick, MD, USA)를 이용하여 강도를 구한 후 해당하는  $\beta_2$ M의 강도로 나눈 다음, 이 수치들 중 대조군에서의 수치를 1로 하여 각 실험의 수치를 비율로 나타내어 비교하였다. 실험은 3회 이상 시행하여 평균과 표준편차를 구하였으며 결과에 대한 차이는 반복 측정자료의 분산분석법(repeated measures ANOVA test)을 이용하였고 다중비교(multiple comparisons)를 추가하여 유의수준  $p < 0.05$ 를 유의한 것으로 하였다.

### Western blot 분석

배양된 NCI-H292 세포주에 대한 각 실험 이후 radioimmunoprecipitation assay buffer(1% NP-40, 0.5% sodium

deoxycholate, 0.1% SDS)를 이용하여 cell lysates를 만든 다음, 단백질의 양을 bovine serum albumin을 이용한 bicinchronic acid protein assay로 측정한 후 단백질 30  $\mu$ g씩을 각 lane에 넣어 전기영동을 시행하였다. 전기영동은 8% SDS-polyacrylamide gel을 이용하였고, 전기영동 후 nitrocellulose막에 전이시킨 다음 이 막을 0.05% Tween-20이 함유된 Tris-buffered saline(TBST)로 희석한 다음 10% non-fat dry milk로 4°C에서 12시간 반응시킨 후 p-ERK (1 : 1,000), p-p38 MAPK(1 : 1,000), p-JNK(1 : 1,000) 항체를 각각 실온에서 4시간 동안 반응시켰다. 또한 *MUC5AC* 단백질의 발현은 *MUC5AC* 항체(Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA)(1 : 1,000)를 첨가하여 반응시켰다. 이후 TBST로 세척한 다음 1 : 5,000으로 희석한 horseradish peroxidase가 결합된 이차 항체(Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ, USA)로 1시간 동안 처리하고 수 차례의 세척을 시행한 후 enhanced chemiluminescence와 자기방사 기록법(autoradiography)을 이용하여 띠(band)를 확인하였다. 한편 nitrocellulose 막을 deprobing한 다음 같은 방법을 이용하여  $\alpha$ -tubulin 항체(Santa Cruz Biotechnology)와 반응을 시켰다. 확인된 밴드의 세기는 Scion Image(Scion Co., Frederick, MD, USA)를 이용하여 강도를 구한 후 해당하는  $\alpha$ -tubulin의 강도로 나눈 다음, 이 수치들 중 대조군에서의 수치를 1로 하여 각 실험의 수치를 비율로 나타내어 비교하였다. 실험은 3회 이상 시행하여 평균과 표준편차를 구하였으며 결과에 대한 차이는 반복 측정자료의 분산분석법(repeated measures ANOVA test)을 이용하였고 다중비교(multiple comparisons)를 추가하여 유의수준  $p < 0.05$ 를 유의한 것으로 하였다.

multiple comparisons)를 추가하여 유의수준  $p < 0.05$ 를 유의한 것으로 하였다.

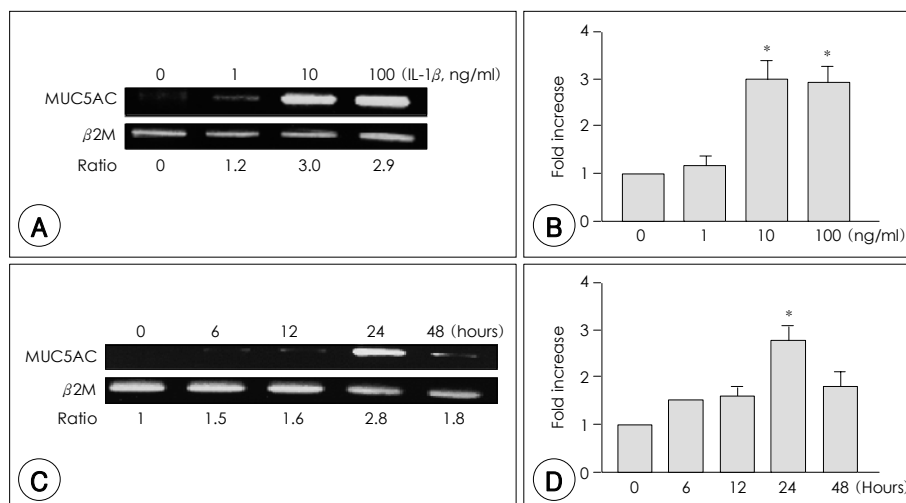
### 세포증식 분석

NCI-H292 세포주를 well당 2,000개씩 분주하여 96 well plate에서 16시간 동안 배양한 다음 각 조건으로 실험 후 세포증식 분석을 시행하였다. 분석은 Cell Titer 96 AQueous One Solution Proliferation Assay Kit(Promega Inc., Madison, WI, USA)를 사용하였다. 방법으로 kit에 포함된 tetrazolium 합성물 2 ml와 phenazine ethosulfate 100  $\mu$ l를 섞은 후 well당 20  $\mu$ l의 혼합 용액을 첨가하였다. 이 후 1시간 동안 37°C, 5% CO<sub>2</sub>의 환경에서 96 well plate를 배양한 후 spectrophotometer(490 nm 파장)로 흡광도(optical density)를 측정하였다. 실험은 3회 이상 시행하여 평균과 표준편차를 구하였으며 결과에 대한 차이는 반복 측정자료의 분산분석법(repeated measures ANOVA test)을 이용하였고 다중비교(multiple comparisons)를 추가하여 유의수준  $p < 0.05$ 를 유의한 것으로 하였다.

## 결 과

### 사람 호흡기 상피세포에서 IL-1 $\beta$ 에 의한 *MUC5AC* 유전자의 발현

NCI-H292 세포주에 1, 10, 100 ng/ml의 IL-1 $\beta$ 를 24시간 동안 각각 첨가 배양하여 *MUC5AC* 유전자의 발현을 알아보았다. IL-1 $\beta$ 를 첨가하지 않은 대조군의 유전자 발현과

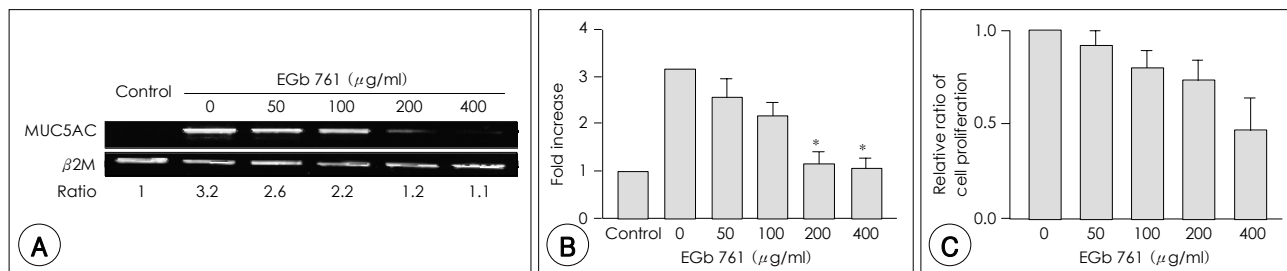


**Fig. 1.** Effect of IL-1 $\beta$  on *MUC5AC* gene expression in NCI-H292 cells. A : Confluent cells were treated with various concentrations of IL-1 $\beta$  for 24 hours, and mRNA levels of *MUC5AC* were determined by RT-PCR. *MUC5AC* expression was normalized to the level of  $\beta$ 2M expression and is reported as a ratio of *MUC5AC* to  $\beta$ 2M. B : Fold increase of *MUC5AC* mRNA according to the concentration of IL-1 $\beta$ . C : Confluent cells were stimulated for indicated times with 10 ng/ml IL-1 $\beta$ , and mRNA levels of *MUC5AC* were determined as the same method. D : Fold increase of *MUC5AC* mRNA according to the incubation time with IL-1 $\beta$ . The figures shown are representative of three independent experiments. \* :  $p < 0.05$  compared with the control.

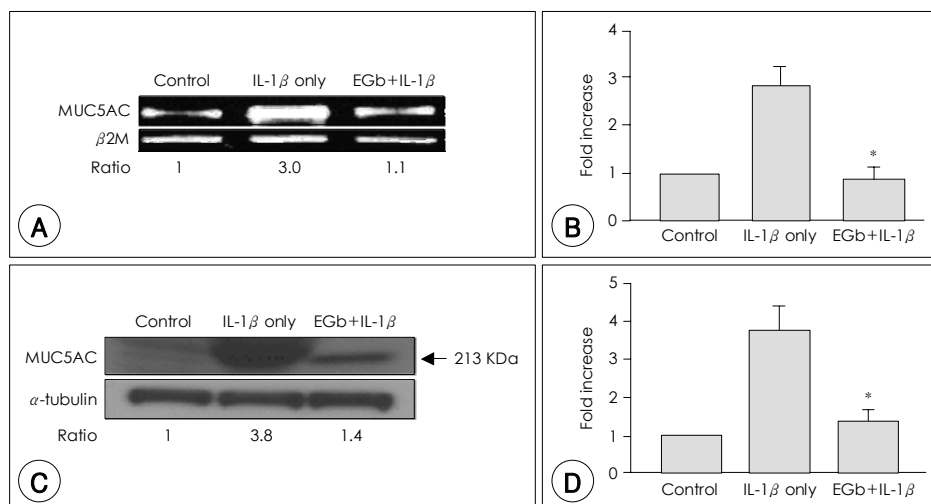
비교한 상대적 비율은 1, 10, 100 ng/ml의 IL-1 $\beta$ 를 첨가 시 각각  $1.2 \pm 0.2$ ,  $3.0 \pm 0.4$ ,  $2.9 \pm 0.3$ 으로 나와 10 ng/ml 이상의 농도로 IL-1 $\beta$ 를 투여 시에 *MUC5AC* 유전자의 발현이 유의하게 증가하였고( $p < 0.05$ ), 10 ng/ml 농도의 IL-1 $\beta$ 에서 가장 발현이 증가하였다(Fig. 1A, B). 그리고 10 ng/ml IL-1 $\beta$ 를 시간대별(0-6-12-24-48시간)로 첨가 배양한 후 *MUC5AC* 유전자의 발현 정도를 알아보았다. 대조군인 0시간과 비교한 6, 12, 24, 48시간의 유전자 발현의 상대적 비율은 각각  $1.5 \pm 0.1$ ,  $1.6 \pm 0.2$ ,  $2.8 \pm 0.3$ ,  $1.8 \pm 0.3$ 으로 나와 24시간 동안 첨가 배양한 경우 *MUC5AC* 유전자의 발현이 최대로 나타났으며 48시간 동안 첨가 배양한 경우 발현이 감소하였다( $p < 0.05$ )(Fig. 1C, D). 이러한 결과로 이후 실험은 IL-1 $\beta$ 를 10 ng/ml 농도로 24시간 동안 첨가 배양하여 시행하였다.

### EGb 761에 의한 *MUC5AC* 유전자 발현 억제와 세포 생존율

NCI-H292 세포주에 10 ng/ml IL-1 $\beta$ 를 첨가하기 1시간 전에 0, 50, 100, 200, 400  $\mu$ g/ml의 농도로 EGb 761을 투여한 후 IL-1 $\beta$ 를 첨가 배양하였다. IL-1 $\beta$ 와 EGb 761을 모두 첨가하지 않은 대조군과 비교한 상대적 비율은 각각 0, 50, 100, 200, 400  $\mu$ g/ml 순으로  $3.2 \pm 0.4$ ,  $2.6 \pm 0.5$ ,  $2.2 \pm 0.4$ ,  $1.2 \pm 0.3$ ,  $1.1 \pm 0.3$ 였다. 결과 상 EGb 761 200  $\mu$ g/ml의 농도부터 *MUC5AC* 유전자의 발현이 EGb 761을 첨가하지 않은 군에 비해 유의하게 억제되었다( $p < 0.05$ )(Fig. 2A, B). 이러한 *MUC5AC* 억제작용이 EGb 761의 독작용인가를 보기 위해 세포증식 억제 정도를 관찰하였다. EGb 761을 첨가하지 않은 대조군과 비교한 상대적인 세포증식 억제율은 50, 100, 200, 400  $\mu$ g/ml에서 각각  $0.94 \pm 0.08$ ,  $0.86 \pm 0.09$ ,  $0.74 \pm$



**Fig. 2.** Suppression of *MUC5AC* gene expression by EGb 761. A : NCI-H292 cells were pretreated with 0, 50, 100, 200, and 400  $\mu$ g/ml EGb 761 for 1 hour and then treated with 10 ng/ml IL-1 $\beta$  for 24 hours. RT-PCR for *MUC5AC* mRNA expression was performed on each group. Compared with the EGb 761-untreated cells, the expression of *MUC5AC* mRNA is significantly suppressed from the treatment with 200  $\mu$ g/ml EGb 761. B : Fold increase of *MUC5AC* mRNA treated with the various concentration of EGb 761. C : The percentage of living cells through cell proliferation assay shows no differences with the EGb 761-untreated cells. The figures shown are representative of three independent experiments. \* :  $p < 0.05$  compared with EGb 761-untreated cells.



**Fig. 3.** Suppression of *MUC5AC* gene and protein expression by EGb 761. A : NCI-H292 cells were pretreated with 200  $\mu$ g/ml EGb 761 before 1 hour and treated with 10 ng/ml IL-1 $\beta$  (EGb+IL-1 $\beta$ ) for 24 hours. The expression of *MUC5AC* mRNA is noted as 3.0-fold increase by IL-1 $\beta$ , but this increase is significantly inhibited to the level of control group by the pretreatment with EGb 761. B : Fold increase of *MUC5AC* mRNA by the treatment with IL-1 $\beta$  only and EGb 761+IL-1 $\beta$ . C : Western blot analysis for *MUC5AC* protein expression was performed on each group and  $\alpha$ -tubulin was employed as the control. The expression of *MUC5AC* protein (213 kDa) induced by IL-1 $\beta$  is suppressed by the pretreatment with EGb 761. D : Fold increase of *MUC5AC* protein by the treatment with IL-1 $\beta$  only and EGb 761+IL-1 $\beta$ . The figures shown are representative of three independent experiments. \* :  $p < 0.05$  compared with IL-1 $\beta$ -treated cells.

0.12,  $0.86 \pm 0.04$ ,  $0.52 \pm 0.25$ 로 측정되어 각 농도에서 유의한 세포고사는 관찰되지 않았다(Fig. 2C).

#### EGb 761에 의한 *MUC5AC* 유전자 및 단백 발현 억제

NCI-H292 세포주에 IL-1 $\beta$  첨가 배양 1시간 전에 200  $\mu$ g/ml의 EGb 761을 전처리한 다음 10 ng/ml의 IL-1 $\beta$ 를 투여하였다. *MUC5AC* 유전자의 발현은 IL-1 $\beta$ 와 EGb 761을 모두 첨가하지 않은 대조군과 비교하여 IL-1 $\beta$ 에 의해  $3.0 \pm 0.5$ 배 증가하였으나, EGb 761을 전처리시에는  $1.1 \pm 0.2$ 배로 유의하게 발현이 억제되었다( $p < 0.05$ )(Fig. 3A, B). Western blot 분석 상 IL-1 $\beta$ 에 의해 *MUC5AC* 단백 발현이  $3.8 \pm 0.6$ 배 유도되나 EGb 761을 전처리한 경우에 있어서는 *MUC5AC* 단백 발현이  $1.4 \pm 0.2$ 배가 되어 대조군 수준으로 억제됨을 확인하였다(Fig. 3C, D).

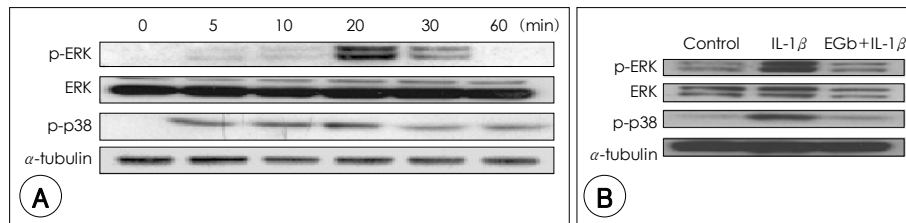
#### ERK와 p38 MAPK 신호전달계에 의한 *MUC5AC* 유전자 발현 억제

10 ng/ml IL-1 $\beta$ 에 의해 MAPK 신호계 중 어느 kinase가 활성화 되는지를 알아보기 위해 ERK, p38 MAPK, JNK 활성화에 대한 특이항체(phospho-specific antibody)를 이용하여 Western blot 분석을 시행하였다. 활성화된 ERK와 p38 MAPK는 IL-1 $\beta$  투여 후 20분에 최대로 발현되었으며 투여

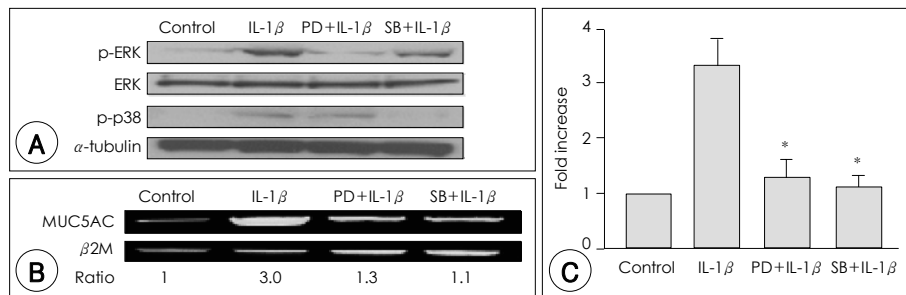
30분 후에는 인산화가 감소되는 양상을 보였다(Fig. 4A). 그러나 JNK의 활성화는 관찰되지 않았다(data not shown). 200  $\mu$ g/ml의 EGb 761을 1시간 전에 전처리하고 IL-1 $\beta$ 를 첨가 배양한 20분 후에 p-ERK와 p-p38 MAPK의 발현 양상을 살펴본 결과, IL-1 $\beta$ 를 단독 처리한 군에 비해 p-ERK와 p-p38 MAPK의 발현이 대조군 수준으로 억제됨을 알 수 있었다(Fig. 4B). 이러한 결과로 EGb 761이 IL-1 $\beta$ 에 의한 ERK와 p38 MAPK의 활성화를 억제하는 것을 알 수 있었다.

#### ERK와 p38 MAPK 특이 억제제에 의한 *MUC5AC* 발현 억제

ERK 활성화에 대한 특이 억제제인 PD98059와 p38 MAPK 활성화에 대한 특이 억제제인 SB203580을 각각 20  $\mu$ M의 농도로 1시간 전에 전처리한 다음 10 ng/ml의 IL-1 $\beta$ 를 24 시간 동안 첨가 배양하여 p-ERK와 p-p38이 억제되는가를 알아보았다. IL-1 $\beta$  만을 처리시 p-ERK와 p-p38 MAPK가 모두 발현되었다. 그러나 PD98059로 전처리시 p-ERK의 발현은 억제되지만 p-p38은 변화가 없었으며, 또한 SB203580으로 전처리시 p-ERK는 변화가 없었으나 p-p38은 발현이 억제되었다(Fig. 5A). 이러한 결과로 각 억제제가 ERK와 p38의 활성을 특이하게 억제하는 것을 확인하였다. 다음 단계로 ERK와 p38 MAPK 경로가 EGb 761에 의한 *MUC5AC*



**Fig. 4.** Mechanism of *MUC5AC* gene suppression by EGb 761. A : NCI-H292 cells were stimulated for the indicated times with 10 ng/ml of IL-1 $\beta$ . The phosphorylation of ERK and p38 MAPK was detected by Western immunoblot analysis using phospho-specific antibodies. ERK is a positive internal control. The phosphorylation of ERK and p38 MAPK is maximally activated at 20 minutes and this effect decreases after 30 minutes. B : NCI-H292 cells were pretreated with 200  $\mu$ g/ml of EGb 761 before 1 hour and treated with 10 ng/ml of IL-1 $\beta$  (EGb+IL-1 $\beta$ ). After 20 minutes incubation, the activation of p-ERK and p-p38 MAPK is strongly inhibited in EGb 761+IL-1 $\beta$  cells compared with IL-1 $\beta$ -treated cells. The figures shown are representative of three independent experiments.



**Fig. 5.** Suppression of *MUC5AC* gene expression by MAPK inhibitors. A : NCI-H292 cells were separately pretreated for 1 hour with 20  $\mu$ M PD98059 or 20  $\mu$ M SB203580 and then stimulated for 24 hours with 10 ng/ml IL-1 $\beta$ . The Western blot assays show that PD98059 (PD+IL-1 $\beta$ ) and SB203580 (SB+IL-1 $\beta$ ) clearly inhibit p-ERK and p-p38 MAPK respectively. B : The inhibition of either ERK or p38 MAPK pathway with PD98059 or SB203580 significantly suppresses *MUC5AC* mRNA expression. C : Fold increase of *MUC5AC* mRNA by MAPK inhibitors. The figures shown are representative of three independent experiments. \* :  $p < 0.05$  compared with IL-1 $\beta$ -treated cells.

발현 억제에 관여함을 확인하기 위해 같은 방법으로 실험한 후 *MUC5AC* 유전자의 발현을 보았다. IL-1 $\beta$ 와 ERK나 p38 특이 억제제를 첨가하지 않은 대조군과 비교한 상대적 비율은 IL-1 $\beta$ 만을 첨가 배양한 경우  $3.3 \pm 0.5$ , PD98059를 전처치한 경우  $1.3 \pm 0.3$ , SB203580을 전처치한 경우  $1.1 \pm 0.2$ 로 나와, ERK나 p38 MAPK 신호전달 경로를 억제함으로써 IL-1 $\beta$ 에 의한 *MUC5AC* 발현이 유의하게 억제되었다 ( $p < 0.05$ ) (Fig. 5B, C).

## 고 찰

기도 염증 반응에서 점액의 과분비는 부비동염, 비염, 기관지염, 혹은 천식 등과 같은 질환의 주된 병태생리로 작용하므로 여러 사이토카인과 점액 유전자의 상호 관련성과 신호전달 기전에 대한 연구를 통해 점액분비를 조절할 수 있는 물질의 개발이 염증성 기도 질환의 발생을 억제하고 개선하는데 중요하다. 이러한 취지로 본 연구에서는 호흡기 상피 세포에서 점액 유전자의 과발현과 점액 분비 증가를 유발하는 염증성 전구사이토카인인 IL-1 $\beta$ 에 의해 유도된 *MUC5AC* 유전자가 Egb 761에 의해 발현이 감소되는 것을 알아보는 것에 주안점을 두었다.

실험 결과 배양된 NCI-H292 세포주에서 10 ng/ml 농도의 IL-1 $\beta$ 로 24시간 동안 첨가 배양 시 *MUC5AC* 유전자의 발현이 유의하게 증가하였으며 이 때 Egb 761을 200  $\mu$ g/ml의 농도로 전처치 시 *MUC5AC* 유전자의 발현이 유의하게 억제되었으며 이러한 발현 억제는 농도의존성이었다. 또한 *MUC5AC* 단백질의 발현도 유의하게 억제되었다. 이 결과는 dexametasone에 의한 MUC2와 *MUC5AC* 점액 유전자의 발현 억제나 budesonide에 의한 MUC2/5AC 점액 유전자와 점액 단백질의 생성 억제와 일치하는 결과였다.<sup>10-12)</sup> 이러한 결과를 토대로 Egb 761이 점액 과분비 조절 기능을 갖고 있는 물질 중 하나라고 간주할 수 있으며 추후 점액 과분비 조절 능력을 지닌 것으로 알려진 물질들에 대한 상호 비교 연구를 통해 더욱 효과적이고 안전한 약제를 선택할 수 있을 것으로 생각한다.

한편, 약제의 개발에서 중요한 점이 안정성이다. 본 실험에서 *MUC5AC* 유전자와 단백질의 발현을 억제하는 최소농도인 200  $\mu$ g/ml에서 세포증식 억제를 본 결과 세포증식 억제가 일어나지 않는 것을 확인하였다. 그리고 안정성에 대한 백서 연구에서 Egb 761을 구강으로 투여할 경우 급성 독성을 나타내는 LD<sub>50</sub>은 7.73 g/kg였고, 정맥내로 주사할 경우 LD<sub>50</sub>은 1.1 g/kg였으며, 복강내로 주사할 경우 LD<sub>50</sub>은 1.9 g/kg였다.<sup>13)</sup> 본 실험에서 사용한 용량을 체중이 70 kg인 사

람의 예로 보면 10 mg/kg을 혈액내로 투여한 것이므로 백서에서 정맥내 투여량과 비교시 약 1/100의 양으로 매우 안전하다 하겠다. 본 실험과 같은 세포실험은 급성 독작용에 대한 것이므로 임상적으로 사용할 경우 만성 독작용이 더욱 중요하다 하겠다. 쥐와 개에 매일 400~500 mg/kg의 용량으로 26~27주 동안 투여시 장기에 부작용이 보이지 않았고 간과 신장에도 부작용이 관찰되지 않았다.<sup>14)</sup> Egb 761을 장기간 복용 시 신경계, 선조직과 눈 등에 최대 20배 정도가 축적된다는 보고를 감안할 경우,<sup>14)</sup> 본 실험에서 사용한 용량은 최대 200 mg/kg의 용량이 정맥내로 투여된 것과 같으므로 상기한 동물실험에서의 결과와 비교시 장기간 투여에도 안전한 용량이라고 생각한다.

MAPK는 점액의 생성과 상피세포의 증식 및 분화, 세포고사와 관련된 신호전달 경로에서 중요한 효소 단백질로서 호흡기 상피세포에서 IL-1 $\beta$ 의 자극에 의해 세포질내 ERK와 p38 MAPK가 활성화되고 핵내 MSK1과 CREB 신호전달 경로가 활성화되면서 *MUC5AC* 유전자와 그 단백질의 합성을 상향 조절한다고 하였다.<sup>15)</sup> 본 연구에서도 IL-1 $\beta$  투여 후 p-JNK의 발현은 관찰되지 않았으며(data not shown), IL-1 $\beta$  투여 20분 경과 후에 p-ERK와 p-p38 MAPK의 발현이 최대로 나타났으며 이에 근거하여 Egb 761을 전처치한 후 IL-1 $\beta$  투여 20분 후 ERK와 p38 MAPK의 활성을 살펴본 결과 두 활성 단백질의 발현이 감소하여 이들이 Egb 761에 의한 *MUC5AC* 발현에 관여함을 알 수 있었다. 또한 ERK와 p38 MAPK에 대한 특이 억제제를 이용하여 *MUC5AC* 유전자 발현 양상을 살펴본 결과에서도 유의하게 *MUC5AC* 발현이 억제되어 ERK와 p38 MAPK가 Egb 761에 의한 *MUC5AC* 발현에서 중요한 신호전달 경로임을 확인할 수 있었다. 한편 호흡기 상피세포에서 IL-1 $\beta$ 에 의한 *MUC5AC* 유전자의 발현에 있어서 ERK와 p38 MAPK 경로 외에 상위 신호전달 경로로 PKC(protein kinase C)와 하위 신호전달 경로로 COX-2와 PGE<sub>2</sub>가 관여한다는 보고가 있으므로,<sup>16)</sup> 향후 이들 신호전달 물질과의 연관성을 비롯하여 다른 경로에 의한 *MUC5AC* 발현 억제의 가능성에도 추가 연구가 필요할 것으로 생각한다.

## 결 론

본 연구로 사람 호흡기 상피세포인 NCI-H292 세포주에서 IL-1 $\beta$ 에 의해 유도된 *MUC5AC* 유전자와 단백질의 발현이 Egb 761의 투여에 의해 유의하게 억제되며, ERK와 p38 MAPK가 Egb 761의 신호전달계로 관여함을 알 수 있었다. 이러한 결과를 바탕으로 Egb 761이 기도 점액 과분비 조절

에 대한 치료제로서의 가능성을 보인다고 생각한다.

중심 단어 : 은행잎 추출물 · *MUC5AC*.

## REFERENCES

- 1) Smith JV, Luo Y. Studies on molecular mechanism of Ginkgo biloba extract. *Appl Microbiol Biotechnol* 2004;64(4):465-72.
- 2) Michel PF. The doyen of trees: the Ginkgo biloba. *Presse Med* 1986; 15(31):1450-4.
- 3) DeFeudis FV. Ginkgo biloba extract (EGb 761): Pharmacological activities and clinical applications. Paris: Elsevier;1991. p.1-8.
- 4) Mutoh M, Takahashi M, Fukuda K, Matsushima-Hibiya Y, Mutoh H, Sugimura T, *et al.* Suppression of cyclooxygenase-2 promoter-dependent transcriptional activity in colon cancer cells by chemopreventive agents with a resorcin-type structure. *Carcinogenesis* 2000; 21:959-63.
- 5) DeFeudis FV. Ginkgo biloba extract (EGb 761): Pharmacological activities and clinical applications. Paris: Elsevier;1991. p.92-6.
- 6) Meade CJ, Heuer H. PAF antagonism as an approach to the treatment of airway hyperreactivity. *Am Rev Respir Dis* 1991;143:S79-82.
- 7) Lee JG, Moon HJ, Kim SS, Kim CW, Yoon JH. Expression and regulation of MUC8 & *MUC5AC* by various cytokines in normal human nasal epithelial cells. *Korean J Otolaryngol* 2001;44:600-5.
- 8) Gray T, Coakley R, Hirsh A, Thornton D, Kirkham S, Koo JS, *et al.* Regulation of *MUC5AC* mucin secretion and airway surface liquid metabolism by IL-1 $\beta$  in human bronchial epithelia. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2004;286:L320-30.
- 9) Song KS, Lee WJ, Chung KC, Koo JS, Yang EJ, Choi JY, *et al.* Interleukin-1 $\beta$  and tumor necrosis factor- $\alpha$  induce *MUC5AC* over-expression through a mechanism involving ERK/p38 mitogen-activated protein kinases-MSK1-CREB activation in human airway epithelial cells. *J Biol Chem* 2003;278:23243-50.
- 10) Kai H, Yoshitake K, Hisatsune A, Kido T, Isohama Y, Takahama K, *et al.* Dexamethasone suppresses mucus production and *MUC-2* and *MUC-5AC* gene expression by NCI-H292 cells. *Am J Physiol* 1996;271:484-8.
- 11) Kim YD, Cho JS, Chang KY, Sin JH, Song SY, Yoon SK. Budesonide down-regulates IL-1 $\beta$ -mediated *MUC2/MUC5AC* genes expression and mucin secretion in human airway epithelial cells. *Korean J Otolaryngol* 2002;45:873-7.
- 12) Kim YD, Kwon EJ, Kwon TK, Baek SH, Song SY, Suh JS. Regulation of IL-1 $\beta$ -mediated *MUC2* gene in NCI-H292 human airway epithelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2000;274:112-6.
- 13) DeFeudis FV. Ginkgo biloba extract (EGb 761): Pharmacological activities and clinical applications. Paris: Elsevier;1991. p.143-6.
- 14) Webster RP, Gawde MD, Bhattacharya RK. Protective effect of rutin, a flavonol glycoside, on the carcinogen-induced DNA damage and repair enzymes in rats. *Cancer Lett* 1996;109:185-91.
- 15) Yoon JH, Baek SJ. Molecular targets of dietary polyphenols with anti-inflammatory properties. *J Yonsei Med* 2005;46:585-96.
- 16) Kim YD, Bai CH, Woo HJ. Interleukin-1 $\beta$ -mediated *MUC5AC* gene expression and mucin secretion via PKC-ERK/p38-COX-2-PGE<sub>2</sub> in human airway epithelial cells. *Korean J Otolaryngol* 2003;46: 27-34.